





DNA POLYMERASE B VARIANT EXHIBITING ENHANCED PERFORMANCE IN PCR

Patent number:	JP2001269188 (A)	Also published as:	
Publication date:	2001-10-02		US2002052036 (A1)
Inventor(s):	SOBEK HARALD DR, FREY BRUNO, ANTRANIKIAN GARABED, BOEHLKE KRISTINA, PISANI FRANCESCA MARIA, ROSSI MOSE +		US6881559 (B2)
Applicant(s):	ROCHE DIAGNOSTICS GMBH +		US2005266436 (A1)
Classification:			US7429468 (B2)
- international:	C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/10; C12N9/12; C12P19/34; C12Q1/68; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/10; C12N9/12; C12P19/00; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/10; C12P19/34; C12Q1/68		
- european:	C12N9/12B7B7		
Application number:	JP20010061781 20010306		
Priority number(s):	EP20000105155 20000311		

Abstract of JP 2001269188 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a thermostable variant of a DNA polymerase B exhibiting an enhanced performance in PCR. **SOLUTION:** This thermostable DNA polymerase B variant suitable for polymerase chain reaction, is characterized by that amino acid(s), preferably tyrosine(s), is/are substituted in the Y-GG/A amino acid motif existing between N-terminal 3'-5'-exonuclease domain and C-terminal polymerase domain of wild-type DNA polymerase B.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-269188
(P2001-269188A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001.10.2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	
1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		9/10	
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 26 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2001-61781 (P2001-61781)	(71) 出願人	591215177 ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベーハー ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム, ザンドホファーシュトラッセ 116
(22) 出願日	平成13年3月6日 (2001.3.6)	(72) 発明者	ハラルド ソベク ドイツ連邦共和国 デイー-82377 ペンツバーク, ビルケンシュトラッセ 29
(31) 優先権主張番号	0 0 1 0 5 1 5 5, 6	(72) 発明者	ブルーノ, フレイ ドイツ連邦共和国 デイー-82377 ペンツバーク, ホッフエルドシュトラッセ 50
(32) 優先日	平成12年3月11日 (2000.3.11)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (E P)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PCRにおける性能が向上したB型DNAポリメラーゼ変異体

(57) 【要約】

【課題】 PCRにおける性能が向上したB型DNAポリメラーゼの熱安定性変異体を提供する。

【解決手段】 野生型のB型DNAポリメラーゼにはN末端の3'-5'-エキソヌクレアーゼドメインとC末端のポリメラーゼドメインとの間にY-GG/Aアミノ酸モチーフが存在するが、変異型の該DNAポリメラーゼでは該モチーフのアミノ酸、好ましくはチロシンが置換されていることを特徴とする、ポリメラーゼ連鎖反応に適している熱安定性のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 野生型のB型DNAポリメラーゼにはN末端の3'-5'-エキソヌクレアーゼドメインとC末端のポリメラーゼドメインとの間にY-GG/Aアミノ酸モチーフが存在するが、変異型の該DNAポリメラーゼでは該モチーフのアミノ酸、好ましくはチロシンが置換されていることを特徴とする、ポリメラーゼ連鎖反応に適している熱安定性のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項2】 チロシンの位置に芳香族側鎖をもつアミノ酸を有する、請求項1記載のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項3】 Y→F、Y→WまたはY→H突然変異を有する、請求項1記載のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項4】 チロシンの位置に親水性側鎖をもつアミノ酸を有する、請求項1記載のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項5】 Y→NまたはY→S突然変異を有する、請求項1記載のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項6】 野生型がEuryarchaeaから得られる、請求項1～5のいずれか1項記載のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項7】 野生型がThermococcus aggregansから得られる、請求項1～6のいずれか1項記載のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項8】 野生型のアミノ酸配列が野生型Tag DNAポリメラーゼのアミノ酸配列と80%以上相同である、請求項1～6のいずれか1項記載のB型DNAポリメラーゼ変異体。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか1項記載の熱安定性B型DNAポリメラーゼ変異体をコードするDNA。

【請求項10】 請求項9記載のDNAを含むベクター。

【請求項11】 請求項10記載のベクターを含む形質転換宿主細胞。

【請求項12】 請求項1～8のいずれか1項記載のB型DNAポリメラーゼ変異体をコードする遺伝子のクローニングおよび突然変異誘発、その後のタンパク質の発現および精製の各ステップを含むことを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項記載のB型DNAポリメラーゼ変異体の取得方法。

【請求項13】 核酸を合成するための、請求項1～8のいずれか1項記載のB型DNAポリメラーゼ変異体の使用。

【請求項14】 PCR反応のための、請求項1～8のいずれか1項記載のB型DNAポリメラーゼ変異体の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、熱安定性のB型DNAポリメラーゼ変異体に関するものである。野生型の該DNAポリメラーゼはN末端の3'-5'-エキソヌクレアーゼドメインとC末端のポリメラーゼドメインとの間にY-GG/A

アミノ酸モチーフを有するが、変異型の該DNAポリメラーゼにおいては該モチーフのアミノ酸が置換されている。このような変異型DNAポリメラーゼはPCR反応に適している。本発明による熱安定性変異体は、野生型DNAポリメラーゼと比べて、PCR反応における性能が優れている。本発明はまた、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）やその他の核酸合成反応においてこれらB型DNAポリメラーゼの熱安定性変異体を使用することに関する。本発明はさらに、本発明の変異体を作製する方法、該変異体をコードする遺伝子を含むベクターならびに細胞系に関する。

【0002】

【従来の技術】 プルーフリーディング（校正）活性をもつDNA依存性DNAポリメラーゼは、2つの触媒活性、すなわちDNAポリメラーゼ活性とエキソヌクレアーゼ活性を協調的に働かせる必要がある。I型DNAポリメラーゼ（大腸菌 Pol I）だけでなく、B型DNAポリメラーゼの場合にも、これらの触媒活性は構造的にはっきりと区別されるタンパク質ドメインに位置づけられている（Truniger, V., Lazaro, J., Salas, M. and Blanco, L. (1996) EMBO J., 15(13), 3430-3441; Pisani, F.M., De Felice, M. and Rossi, M. (1998) Biochemistry, 37(42), 15005-15012）。B型（真核生物型）DNAポリメラーゼでは、2つの触媒活性の協調がN末端の3'-5'-エキソヌクレアーゼドメインとC末端の重合ドメインの間にある保存されたY-GG/Aモチーフにおいて分子内で起こる、と提唱されている（Truniger, V., Lazaro, J., Salas, M. and Blanco, L. (1996) EMBO J., 15(13), 3430-3441; Pisani, F.M., De Felice, M. and Rossi, M. (1998) Biochemistry, 37(42), 15005-15012）。大腸菌DNAポリメラーゼのクレノウフラグメントについては、その校正が局所的状況に依存してDNAの解離および再会合を必要とする分子間または分子内プロセスでありうる、と報告されている（Joyce, C.M. (1989) JBC, 264(18), 10858-10866）。Trunigerらは、Y-GG/Aモチーフの突然変異が、野生型酵素と比べて、重合またはエキソヌクレオリシス(exonucleolysis)のいずれかを優先する表現型へと至らせることを、バクテリオファージφ29の中温菌複製DNAポリメラーゼに関して実証している（Truniger, V., Lazaro, J., Salas, M. and Blanco, L. (1996) EMBO J., 15(13), 3430-3441）。彼らは、この結果が変更された(ss)DNA結合パラメーターに関係していること、また、構造的役割と機能的役割の組合せにおいてポリメラーゼ活性部位とエキソヌクレアーゼ活性部位との連携のために前記モチーフが重要であることを示すことができた。

【0003】 好熱性crenarchaeonのSulfolobus solfataricus (Sso)のDNAポリメラーゼに関しては、酵素-DNA相互作用に関与する70アミノ酸の領域（領域1）が決定された（Pisani, F.M., Manco, G., Carratore, V. and

Rossi, M. (1996) *Biochemistry*, 35, 9158-9166)。それはエキソヌクレアーゼドメインとポリメラーゼドメインの間の連結部に位置づけられ、Y-GG/Aモチーフを含んでいる。Y-GG/Aモチーフ内のアミノ酸の突然変異解析により、上記酵素のこの部分のアミノ酸がブルーフリーディング機能のプロセシビティー(processivity)を決定することが示された(Pisani, F.M., De Felice, M. and Rossi, M. (1998) *Biochemistry*, 37(42), 15005-15012)。バクテリオファージRB69 DNAポリメラーゼの結晶構造に基づいて、Trunigerらは、鋳型として作用する1個のヌクレオチドに先行する2個のヌクレオチドの間のホスホジエステル結合とチロシンとの直接的相互作用を提案している(Truniger, V., Blanco, L. and Salas, M. (1999) *J. Mol. Biol.*, 286, 57-69)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、PCRにおける性能が向上した熱安定性DNAポリメラーゼ、特に、向上したPCR性能を示すB型DNAポリメラーゼの熱安定性変異体を提供することである。本発明によるB型DNAポリメラーゼの変異体は、Y-GG/Aアミノ酸モチーフ内に突然変異を有する。好ましい突然変異はY-GG/Aアミノ酸モチーフ内のチロシンの位置にある。このモチーフに影響を及ぼす他の突然変異もまた、PCRにおけるB型DNAポリメラーゼの性能に影響を与える可能性がある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本明細書中において、PCRにおけるDNAポリメラーゼの性能の向上とは、より高収量のPCR産物、またはより長いDNA標的の増幅をもたらす性能として定義される。さらに、PCR性能の向上とは、増幅プロセスにおける忠実度の向上として定義される。

【0006】好ましいB型DNAポリメラーゼ変異体は、Y-GG/Aアミノ酸モチーフ内のチロシンの位置に突然変異を有する。本発明に従うB型DNAポリメラーゼの好ましい変異体は、チロシンの位置にフェニルアラニン、トリプトファンまたはヒスチジンを有する。本発明によるB型DNAポリメラーゼの他の好ましい変異体は、チロシンの位置にアスパラギンまたはセリンを有する。本明細書中に記載する、Y-GG/Aモチーフ内のチロシンが置換された変異型ポリメラーゼはPCR性能が向上している。

【0007】

【発明の実施の形態】好ましい実施の形態において、本発明のB型DNAポリメラーゼ変異体は、Euryarchaea、より好ましくは*Thermococcus aggregans* (Tag)から得られるB型DNAポリメラーゼの変異体である。特に好ましいものは、ポリメラーゼ連鎖反応を行なう能力があり、至適温度が80℃以上で、サイズが約94 kDaの、Tag由来のB型DNAポリメラーゼの変異体である。

【0008】本発明に関しては、*Thermococcus aggregans*由来のB型DNAポリメラーゼについて詳細に説明するが、他のB型DNAポリメラーゼ、好ましくは*Thermococcus*

*s aggregans*由来のDNAポリメラーゼに対して高度の相同性(80%以上)を示すB型DNAポリメラーゼにも適用することができる。

【0009】*Thermococcus aggregans*由来のB型DNAポリメラーゼは、他の*Thermococcus*種由来のB型DNAポリメラーゼに対して高度のアミノ酸配列相同性を示す。DN Aポリメラーゼの相同性はプログラムBlast 2を使って算出した(Tatusova, T.A. and Madden, T.L. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174, 247-250)。*Thermococcus aggregans* B型DNAポリメラーゼの他の*Thermococcus*種由来の同族酵素に対する相同性は、93%(*T. litoralis*)、87%(*T. gorgonarius*)、86%(*T. furiosus*)、および87%(*T. spec. 9N7*)である。Tag DNAポリメラーゼの*Pyrococcus*種由来のポリメラーゼに対する相同性は、86%(*P. abyssi*)、86%(*P. horikoshii*)、86%(*P. spec. KUD*)、および85%(*P. furiosus*)である。異なるeuryarchaeota由来の他のB型DNAポリメラーゼに対しては、より低い相同性、すなわち、59%(*Methanococcus jannaschii*)、56%(*Methanococcus voltae*)、51%(*Metanobacterium thermocautotrophicum*)、および56%(*Archaeoglobus fulgidus*)であると算出される。crenarchaeotaおよびバクテリオファージ由来のB型DNAポリメラーゼに対する相同性は、46%(*Sulfolobus solfataricus*)、42%(*Sulfolobus acidocaldarius*)、41%(*Sulfurisphaera ohwakuensis*)、51%(*Aeropyrum pernix*)、40%(*Pyrodictium occultum*)、43%(*Cenarchaeum symbiosum*)、38%(バクテリオファージT4)、および39%(バクテリオファージRB69)である。

【0010】上述したように、Y-GG/Aモチーフ内のいくつかの突然変異が、*Sulfolobus solfataricus* (Sso)およびφ29 DNAポリメラーゼに対して行なわれた。これらの突然変異がポリメラーゼ活性(pol)およびエキソヌクレアーゼ活性(exo)に及ぼした影響は、Tag DNAポリメラーゼについて得られた結果と完全に一致するわけではない。したがって、変異体のPCR性能に及ぼす突然変異の影響は予測不能である。

【0011】Tag DNAポリメラーゼの変異体Y387Fは、野生型のTag DNAポリメラーゼと比較して、より高いpol/exo比を示す。Ssoおよびφ29 DNAポリメラーゼについても同様の結果が得られた。変異体G389Aは、φ29 DNAポリメラーゼの対応する変異体とは正反対の作用を示す。すなわち、Tag DNAポリメラーゼにおけるG→Aがポリメラーゼ活性をほとんど消失させるのに対し、φ29 DNAポリメラーゼのG→A変異体ではポリメラーゼ活性が明らかに増強される。Sso DNAポリメラーゼの変異体の場合、エキソヌクレアーゼプロセシビティーが変化した。このこともB型Tag DNAポリメラーゼの変異体には認められなかった。したがって、Y-GG/Aモチーフ内の突然変異が類似していても、それが及ぼす影響は予測することができない。

【0012】要するに、Y-GG/AモチーフはDNAポリメラーゼ活性とエキソヌクレアーゼ活性とを協調させるうえである役割を果たしていることが従来技術から知られているが、従来のDNAポリメラーゼにおいて認められるpol/exo比の変化は、本発明によるTag DNAポリメラーゼの変異体において観察される変化と厳密には相関していない。さらに、Y-GG/AモチーフがPCRにおけるB型DNAポリメラーゼの性能にとって重要であるということは、これまでに記載されていない。その上、pol/exo比の変化と、PCRにおけるDNAポリメラーゼ性能の向上と、の間には相関関係がない。例えば、変異体Y387Hは野生型に比してpol/exo比の変化を示さないものの、PCRにおけるその性能は向上している。さらに、Tag DNAポリメラーゼの変異体Y387NおよびY387Sについては、忠実度の顕著な向上が認められた。

【0013】Tag DNAポリメラーゼの変異体について得られた結果を以下に詳細に説明する。

【0014】野生型および変異型Tag DNAポリメラーゼの酵素活性
Tag DNAポリメラーゼの野生型酵素と変異型酵素の酵素活性を測定し、分析した(図1)。DNAポリメラーゼ活性は実施例2に記載したように測定した。突然変異がポリメラーゼ活性に及ぼす影響により、変異体は次の3つのグループに大別された。すなわち、i) 野生型に比してDNAポリメラーゼ活性が増大している変異体(変異体Y387F)、ii) DNAポリメラーゼ活性が野生型と同様であるか、野生型よりわずかに低下している変異体(変異体Y387WおよびY387H)、およびiii) DNAポリメラーゼ活性が低下している変異体(変異体Y387N、Y387S、G389A)である。

【0015】エキソヌクレアーゼ活性は実施例3に記載したように測定した。突然変異がエキソヌクレアーゼ活性に及ぼす影響により、変異体は次の2つのグループに大別された。すなわち、i) 野生型酵素と同様のエキソヌクレアーゼ活性を示す変異体(変異体Y387F、Y387W、Y387H)、およびii) 野生型酵素に比してエキソヌクレアーゼ活性が増大している変異体(変異体Y387NおよびY387S、G389A)である。

【0016】得られたポリメラーゼ活性とエキソヌクレアーゼ活性のデータから、両活性(pol/exo)の比をTag DNAポリメラーゼの野生型酵素と変異型酵素について求めた(図1)。3種の変異体(変異体Y387F、Y387W、Y387H)は野生型酵素(WT)より高いか、またはそれと同様のpol/exo比を示した。3種の変異体(変異体Y387NおよびY387S、G389A)は野生型酵素(WT)と比べて明らかに低下したpol/exo比を示した。

【0017】PCR性能
PCR反応用に最適化したバッファー中で、野生型酵素と変異型酵素を入DNAに対するPCRに供した。変異体G389Aを除く全ての変異体がPCRを行なうことができたが、一

定量(1 pmol)の酵素を用いたにもかかわらず様々な量のPCR産物をもたらした。DNA標的の長さが増すにつれて、酵素の性能に差が生じた(図2)。1 pmolの変異体Y387S、Y387NまたはG389Aを用いて3.3 kbフラグメントを増幅しようとしても、PCR産物はまったく得られなかった。1 pmolの野生型DNAポリメラーゼは長さが5.0 kbのフラグメントを増幅することができなかった。一方、変異体Y387W、Y387FおよびY387Hは長さが7.5 kbのフラグメントを増幅することができた。対照として、Taq DNAポリメラーゼ、Pwo DNAポリメラーゼおよびExpandTM High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals)を使用した。

【0018】また、PCR実験において異なる伸長時間を用いて2 kbフラグメントを増幅することによりPCR性能の差を明らかにした。これらの条件下では、変異体G389Aを除いて、試験した全酵素が伸長時間90秒/サイクルで2 kbフラグメントを増幅することができた。変異体Y387F、Y387WおよびY387Hは短縮された伸長時間40秒/サイクルで該フラグメントを増幅し、変異体Y387Hは30秒/サイクルで標的を増幅することができた(図3)。

【0019】エキソヌクレアーゼプロセシビティー
酵素のエキソヌクレアーゼプロセシビティーはヘパリントラップ(heparin trap)法に基づく実験で調べた(Reddy, M.K., Weitzel, S.E. and von Hippel, P.H. (1992) J. Biol. Chem., 267(20), 14157-14166; Pisani, F. M., De Felice, M. and Rossi, M. (1998) Biochemistry, 37(42), 15005-15012)。一定量(1 pmol)のTag DNAポリメラーゼまたはその変異体を、ヌクレオチドの不在下で、5'-DIG標識24merオリゴヌクレオチドと共に68°Cで4分間インキュベートした。ヘパリンの不在下では、該オリゴヌクレオチドはTag酵素によって連続的に分解された(陽性対照、図4、レーン「-」)。ヘパリントラップ法の機能は、酵素の結合前にヘパリンとMnCl₂を添加することで実証された(陰性対照、図4、レーンB)。単一の代謝回転の条件(反応を開始させるために酵素の結合後にヘパリンとMnCl₂を添加)により、Tag DNAポリメラーゼによるオリゴヌクレオチドのエキソヌクレオリシスが生じた(図4、レーンA)。これらの酵素は、分解されなかった残存オリゴヌクレオチドの量が異なることにより示されるように、エキソヌクレオリシス活性に差があった。しかし、試験した全ての酵素において、オリゴヌクレオチドは同程度(8 nt)に分解された。このことは、これらの酵素のエキソヌクレアーゼプロセシビティーが近似していることを示している。

【0020】*Thermococcus gorgonarius* DNAポリメラーゼは、強力なエキソヌクレアーゼ活性を示すので、陽性対照として使用した。この酵素はヘパリンの不在下で24merオリゴヌクレオチドを15塩基長より短いオリゴヌクレオチドへと分解した(図4、レーン「-」)。単一の代謝回転の条件下で、オリゴヌクレオチドの強力な分解

(11 nt) が認められる (図4、レーン「A」)。

【0021】忠実度

増幅の際のエラー率を、変異型酵素と野生型DNAポリメラーゼについて測定した。FreyとSuppmannにより報告された、PCRをベースとした忠実度アッセイを採用した (Frey, M. and Suppmann, B. (1995) Biochemica, 2, 34-35)。この方法は、pUC19誘導体であるpUCQ17 (機能性lacI^q対立遺伝子を含む) の増幅、環化および形質転換を基礎とするものである (Barnes, W.M. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 2216-2220)。PCRにより誘導されるlacIの突然変異は、lacZ α 発現の抑制解除とその後の機能性 β -ガラクトシダーゼ酵素 (X-Gal指示プレート上で検出できる) の形成をもたらす。

【0022】5回の別々の実験において、野生型Tag DNAについての平均エラー率は 5.0×10^{-6} であった。この数値は、同様の実験で測定したExpandTM High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals)の平均エラー率 1.8×10^{-6} とTaq DNAポリメラーゼ (Roche Molecular Biochemicals)の平均エラー率 1.3×10^{-5} の中間にある。データのより良い比較のために、Taq DNAポリメラーゼの測定されたエラー率を、Tag DNAポリメラーゼおよびその変異体の測定されたエラー率で割った商をプロットした。別個の実験において、Taq DNAポリメラーゼのエラー率は $1.2 \sim 3.05 \times 10^{-5}$ の範囲で変化した。

【0023】図5は、Tag DNAポリメラーゼの野生型酵素と変異型酵素のエラー率の商を示す。PCR性能の向上を示す変異体 (Y387W、Y387F、Y387H)のエラー率は、野生型酵素について得られた数値と有意差がなかった。エキソヌクレアーゼ活性が増大した変異体 (Y387N、Y387S)は忠実度が向上した (図5)。変異体Y387NおよびY387Sの平均エラー率は、それぞれ 6.3×10^{-7} および 6.2×10^{-7} であると測定された。

【0024】 ϕ 29 DNAポリメラーゼおよびSso DNAポリメラーゼと対照的に、Tag DNAポリメラーゼはPCRに適している。チロシンの位置に芳香族アミノ酸をもつ変異型酵素 (Y387F、Y387W、Y387H)は、PCR性能の向上のほかに、同様のまたはほんのわずかに増大したDNAポリメラーゼ活性を示した。

【0025】忠実度アッセイにおいて、変異体Y387F、Y387WおよびY387Hのエラー率は有意に変化しないことがわかった。これに対して、変異体Y387NまたはY387Sはより高いエキソヌクレアーゼ活性を示し、忠実度が向上していた。

【0026】さらに、本発明の課題は、遺伝子のクローニングおよび突然変異誘発、その後のタンパク質の発現および精製の各ステップを含むことを特徴とする、本発明によるB型変異体の作製方法である。

【0027】また、本発明の主題は、野生型の熱安定性B型DNAポリメラーゼにはN末端の3'-5'-エキソヌクレアーゼドメインとC末端のポリメラーゼドメインとの間

にY-GG/Aアミノ酸モチーフが存在するが、該DNAポリメラーゼの変異型酵素では該モチーフのチロシンが置換されていることを特徴とする、PCRに適したB型DNAポリメラーゼ変異体をコードするDNAである。

【0028】好ましくは、上記の野生型DNAはEuryarchaea、より好ましくはThermococcus aggregans(Tag)から得られるものである。本発明の主題はまた、本発明によるDNAを含有するベクターである。適当なベクターは例えば次のもの、pET14b/15b/16b/19b (Novagen); pRSET (Invitrogen); pTrcHis (Invitrogen); pHAT10/11/12 (Clontech); pPRO Tet.E/Lar.A (Clontech); pCALn/n-EK (Stratagene); pGEMEX-1/-2 (Promega)である。

【0029】さらに、本発明の主題は上記のベクターを含む細胞である。適当な細胞は例えば供給業者が推奨するベクターと組み合わせた大腸菌BL21、BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS、BL21(DE3)pLysE、DH5 α PRO、JM109(DE3)、TOP10である。個々の発現ベクターに応じて、遺伝子をサブクローニングしたり、タンパク質の精製法を改変する必要があるかもしれない。

【0030】Tag DNAポリメラーゼを発現する組換え菌株のサンプルは、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig)に寄託し、受託番号DSM 13224を指定された。

【0031】本発明のさらなる主題は、本発明による変異型酵素を、例えばPCRにおいて、核酸の合成に使用することである。

【0032】好適な実施の形態の詳細な説明、
図面

図1：二本鎖DNAに対する、Tag DNAポリメラーゼおよびその変異体の相対的ポリメラーゼ活性(Pol)および3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性(Exo)を示した図である。アッセイはそれぞれ実施例2および3に記載したように行なった。活性は、野生型Tag DNAポリメラーゼについて得られた活性のパーセントとして表してある。

【0033】図2：Tag DNAポリメラーゼ変異体を用いて行なったPCRを示した図である。Tag DNAポリメラーゼ変異体 (1 pmol) を、鋳型としての10ngの λ DNA、表示した長さのフラグメントをもたらすように設計した30 pmolのプライマーセット、200 μ MずつのdNTPおよび適当なPCRバッファーと共に総量50 μ l中でインキュベートした。反応は94°Cで10秒、57°Cで30秒、72°Cで3.0分(A)、4.3分(B)または7.0分(C)の伸長時間を10サイクル、続いて伸長時間を20秒/サイクルだけ延長して20サイクル行なった。PCR後、5 μ lのサンプルを1%アガロースゲル電気泳動に供した。対照反応の場合は、2.5UのTaq DNAポリメラーゼ、Pwo DNAポリメラーゼまたはExpandTM High Fidelity PCR Systemを用いた。各レーンの省略語については図6で説明する。

【0034】図3：時間依存的ポリメラーゼ連鎖反応。

最小伸長時間を決定するために、異なる伸長時間（表示したように90秒、40秒、30秒）を用いて行なった反応からの2kb PCR産物を示す1%アガロースゲル電気泳動の図である。1 pmolの各Tag DNAポリメラーゼ変異体または野生型酵素を、10ngのλDNAと、2 kbのDNAフラグメントをもたらしように設計したプライマーセットの混合物に添加した。各レーンの表示については図6で説明する。各変異体について、反応を2回ずつ繰り返した。各ゲルの右側のレーンのPwoは、対照反応としての2.5UのPyrococcus woesei DNAポリメラーゼ(Roche Molecular Biochemicals)である。各ゲルの左側のレーンは分子量マーカーVI(Roche Molecular Biochemicals)である。伸長時間40秒の反応においては、変異型GAを除外した。30秒の反応では、変異型YSについて1回の反応物のみをゲルに供した。

【0035】図4：3'-5'-エキソヌクレアーゼプロセシビティ。試験したTag DNAポリメラーゼ変異体を図の上部に示す。対照反応（30秒間インキュベーション）としてTgo DNAポリメラーゼを使用した。野生型および変異型のTag DNAポリメラーゼの反応は、68°Cで1分間のプレインキュベーション後に68°Cで4分間行なった。レーン「P」：対照反応（インキュベーションなしの24mer 5'-DIG標識プライマー）；レーン「-」：ヘパリンの不在下での反応（陽性対照）；レーン「B」：酵素の添加前にヘパリンとMnCl₂を添加した反応（陰性対照）；レーン「A」：酵素の添加後にヘパリンとMnCl₂を添加した反応（単一の代謝回転の条件下での反応）。

【0036】図5：Tag DNAポリメラーゼ変異体の忠実度。Taq DNAポリメラーゼの忠実度に対してTag DNAポリメラーゼおよびその変異体の忠実度を表した図である。商1は、TagDNAポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼと同じエラー率をもつことを意味する（平均値 1.3×10^{-5} ）。1より大きい値は、その倍率だけポリメラーゼがTaq DNAポリメラーゼより低いエラーを示すことを反映している。棒は2〜5回の独立した実験から求めた平均値に相当し、誤差棒のないものは0.36より小さいものである。酵素の省略語については、図6で説明するとおりである。対照として、Pyrococcus woesei DNAポリメラーゼ(Roche Molecular Biochemicals)およびExpandTM High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals)を用いた（「Taq/Pwo」と「Taq/HiFi」）。

【0037】図6：精製した変異型タンパク質のSDS-PAGEゲル電気泳動分析。1 μgの各変異体を10% SDS-PAGEゲルでの電気泳動に供した。左から、MW：分子量マーカー；WT：Thermococcus aggregans 野生型DNAポリメラーゼ；YF、YW、YS、YN、YHは、チロシン387の位置でそれぞれフェニルアラニン、トリプトファン、セリン、アスパラギン、ヒスチジンに置換されている対応の変異体であり、GAはThermococcus aggregans DNAポリメラーゼの遺伝子におけるグリシン389のアラニンへの突然変異で

ある。全ての変異体は野生型酵素と同じクロマトグラフ挙動および溶解性を示した。

【0038】図7：定性的エキソヌクレアーゼアッセイ。エキソヌクレアーゼ活性を試験するための基質としてDNA分子量マーカーを用いた（DNA分子量マーカーII(MWII)、Roche Molecular Biochemicals）。1 μgのMWIIを1 pmolの各Tag DNAポリメラーゼ変異体と共に、200 μMのdNTPの存在下(A)または不在下(B)に65°Cで6時間インキュベートした。Tag変異体は図6で説明したとおりの省略語で示してある。エキソヌクレアーゼ活性に関する該タンパク質の定性的ランク付けは、GA>YN>YS>YH>YF=YW=WTである。

【0039】図8：euryarchaeaおよびcrenarchaeaのB型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列の多重アライメントから誘導された、Thermococcales目(order)由来のB型DNAポリメラーゼのコンセンサス配列モチーフ。Y-GG/Aモチーフを含む24アミノ酸の領域をClustalW Softwareプログラム(Higgins, EMBL Heidelberg, Germany)により解析した。全てのarchaea B型DNAポリメラーゼにおいて保存されているアミノ酸（Y-GG/Aモチーフに類似）のほかに、コンセンサス配列「E-RR-R----G(Y)-KE-EE--LWE-」を規定することができる。この配列はThermococcales目に属する全DNAポリメラーゼの配列中に見いだされ、これらのDNAポリメラーゼの80%を超える相同性と一致する。crenarchaea種であるSulfolobus solfataricus, Sulfolobus acidocaldarius, Pyrobaculum islandicum, Pyrodictium occultum, Aeropyrum pernix, Sulfurisphaera ohwakuensisの配列、およびいくつかのeuryarchaea種であるThermococcus（「T.」）、Pyrococcus（「P.」）、Methanococcus（「M.」）の配列のアライメントを行なった。

【0040】図9：組換え野生型Tag DNAポリメラーゼのDNA配列および推定アミノ酸配列。天然の遺伝子（受託番号Y13030）中に存在する3つのイントロンがPCRにより検出された(Niehaus, F., Frey, B., Antranikian, A. (1997) Gene, 204, 153-158)。PCRの間に、アミノ酸交換へと至らせる4つの突然変異が導入された。アミノ酸交換（天然→組換え）は、L3F、A404T、S410CおよびL492Hである。

【0041】

【実施例】実施例1

部位特異的突然変異誘発およびTag DNAポリメラーゼ変異体の発現

Tag DNAポリメラーゼ(polTY)の遺伝子のクローニングは以前に記載されている(Niehaus, F., Frey, B., Antranikian, A. (1997) Gene, 204, 153-158)。大腸菌でのTag DNAポリメラーゼの過剰発現は、それをコードする遺伝子を、精製のためのN末端Hisタグを含むIPTG誘導性pET15bベクター(Novagen)にサブクローニングすることにより行なった（得られたプラスミドはpET15b-TagPolと

命名した)。

【0042】この研究で提供する変異体は、ミスマッチとして目的の突然変異を含むプライマーを使ってポリメラーゼ連鎖反応により作製した。フォワードプライマーは、普遍的に、突然変異部位の約100 bp上流の配列に一致する「Kpn-fw」であり、polTy遺伝子のKpnI制限部位

Kpn-Fw 5'-GCAACCTTGTAGAGTACAGTGCTACCTGTTAAGGG-3';

配列番号2

TagY387F 5'-GCCCTCTTTCCGGCTCTTTTACGTATCCTCCCAGGAAAGTAGTCC-3',

配列番号3

TagY387H 5'-GCCCTCTTTCCGGCTCTTTTACGTATCCTCCCAGGTGAGTAGTCC 3',

配列番号4

TagY387N 5'-GCCCTCTTTCCGGCTCTTTTACGTATCCTCCCAGGTTAGTAGTCC 3',

配列番号5

TagY387S 5'-GCCCTCTTTCCGGCTCTTTTACGTATCCTCCCAGGGAAGTAGTCC-3',

配列番号6

TagY387W 5'-GCCCTCTTTCCGGCTCTTTTACGTATCCTCCCAGCCAAGTAGTCC-3',

配列番号7

TagG389A 5'-GCCCTCTTTCCGGCTCTTTTACGTATCCAGCCAGCTAAGTAGTCC-3'.

PCR反応は、Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals)を用いて次のプログラムで実施した：94℃で2分後、94℃で10秒、55℃で30秒、72℃で30秒を30サイクル。得られた139 bpフラグメントを制限酵素KpnIとSnaBIで消化して101 bpフラグメントを得、これを制限酵素KpnIとSnaBIで消化して線状にしたpET15b-TagPolに連結させた。クローン化DNAフラグメントの配列を解析して、目的の突然変異が存在することを確認した。

【0044】タンパク質を発現させるため、大腸菌BL21 (DE3)細胞を発現ベクターpET15b-TagPolで形質転換した。100 µg/mlのアンピシリンを補充したLB培地15mlに3〜5個のコロニーを接種し、OD_{600nm}=0.3となるまで増殖させた。予備培養物のアリコート(10ml)を500mlのLB培地に接種し、振盪しながら37℃でインキュベートした。OD_{600nm}=0.6でIPTG (最終濃度：1 mM)を添加して発現を誘導した。3時間のインキュベーション後、遠心分離により細胞を回収し、50mM Tris-HCl/pH7.5、10mM KCl、0.5mM EDTA、4mM MgCl₂、5mM DTT中に懸濁した。細胞を氷上で超音波処理し、粗製抽出物を80℃へと15分間加熱した。細胞破片を遠心分離(30,000xg、4℃で30分)により取り除いた。上清を、バッファーA(50mM Tris-HCl/pH7.5、10mM KCl、4mM MgCl₂)で平衡化したBlue Sepharose 3G-Aカラム(Pharmacia)にアプライした。タンパク質は0.01〜1.5M KClの勾配を用いて溶出した。活性画分をプールし、20mM Tris-HCl/pH7.9、5mM イミダゾール、500mM NaClに対して透析した。同じバッファーで平衡化したNi-キレートカラム(Novagene)にサンプルをアプライし、0.005〜1M イミダゾールの勾配を用いて溶出した。活性画分をプールし、保存バッファー(50mM Tris-HCl/pH7.5、100mM KCl、0.5mM EDTA、5mM DTT、

を含んでいた。リバースプライマーはSnaBI制限部位とさらに目的の突然変異を含んでいた。オリゴヌクレオチドの配列は次のとおりである(突然変異誘発のためのミスマッチ部位には下線を引いてある)。

【0043】配列番号1

50% グリセロール)に対して透析した。酵素はSDSゲル電気泳動から明らかなように純化されていた(図6)。

【0045】実施例2

DNAポリメラーゼアッセイ

DNAポリメラーゼの活性は、DNA基質への α -(³²P)dCTPの取り込みを測定することで調べた。試験混合物(50 µl)は、5 µlの10x Tag反応バッファー(100mM Tris-HCl/pH 8.9、750mM KCl、15mM MgCl₂、100mM CHAPS)、200 µM ずつのdATP、dGTP、dTTP、100 µM dCTP、1mCi α -(³²P)dCTP、1 µgのM13mp9 ssDNA (0.3 µgのM13プライマーをアニーリングさせたもの)を含んでいた。アッセイは2および3 µlの酵素を3種類の希釈率(酵素の最終量 2.5〜15fmole)で用いて6反応を行ない、平均値を求めた。基準としてPwo DNAポリメラーゼを使用した。DNA/プライマー混合物を調製するには、277.2 µgのM13mp9 ssDNA (Roche Molecular Biochemicals)と156 µgのM13配列決定用プライマー(17merフォワードプライマー、Roche Molecular Biochemicals)とを55℃で30分間加熱し、次いでそれを室温へと30分間冷却した。

【0046】アッセイ反応を65℃で30分インキュベートし、氷上で500 µlの10% TCA (4℃)を添加して停止させ、氷上にさらに10分置いた。サンプルをGFCフィルター(Whatman)で濾過し、フィルターを5% TCAで3回洗浄し、2mlのシンチレーション液体中でβカウンターにより計測した。1ユニットは、65℃、30分で酸不溶性物質に10nM dNTPを組み込むのに必要とされる酵素の量として定義される。

【0047】実施例3

エキソヌクレアーゼアッセイ

活性についてのアッセイ：3 µl (300ng)の酵素(約5ユニットのポリメラーゼ活性)を、5 µgの3H標識ウシ胸

腺DNAと共に、10mM Tris-HCl/pH8.9、75mM KCl、1.5mM MgCl₂、10mM CHAPSを含むバッファー中で65℃、4時間インキュベートした。ウシ胸腺DNAから放出された放射能をシンチレーションカウンターで計測した。

【0048】用いたアッセイでは、3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性と5'-3'-エキソヌクレアーゼ活性とを正しく区別することができない。ThermococcalesのB型ポリメラーゼには、5'-3'-エキソヌクレアーゼ活性が表現型的にも遺伝子型的にもこれまで検出されていない(Perler, F.B., Kumar, S. and Kong, H. (1996) Adv. Prot. Chem., 48, 377-435)。したがって、得られた値は3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性であると見なすことができる。

【0049】別のアッセイにおいては、1 μgの分子量マーカーII (Roche Molecular Biochemicals)を、上記と同じバッファー中で、5Uの酵素と共に200 μMずつのdNTPの存在下または不在下に、最終容量50 μlにて65℃、6時間インキュベートした。反応産物は1%アガロースゲルでの電気泳動により分離した。

【0050】3'-5'-エキソヌクレアーゼプロセシビティについてのアッセイ：以前に報告されたヘパリントラップ法を用いた(Reddy, M.K., Weitzel, S.E. and von Hippel, P.H. (1992) J. Biol. Chem., 267(20), 14157-14166; Pisani, F.M., De Felice, M. and Rossi, M. (1998) Biochemistry, 37(42), 15005-15012)。10mM Tris-HCl/pH8.9、75mM KCl、10mM CHAPSおよび0.5pmoleの5'-DIG標識24merオリゴヌクレオチドを含む反応混合物(10 μl)をサーモサイクラー内で68℃、1分間予め温めておいた。特にことわらない限り、1 pmolの酵素を基質と共に68℃で1分間プレインキュベートした。MnCl₂(最終濃度 4mM)とヘパリン(最終濃度 1mg/ml)を添加して反応を開始させ、単一の代謝回転の条件を確実にした。4分のインキュベーション後、5 μlのホルムアミドバッファー(80% ホルムアミド、10mM EDTA、1mg/ml ブロモフェノールブルー、1mg/ml キシレンキサノール)を添加して反応を停止させた。ヘパリントラップの有効性を調べるために、対照反応として酵素の添加前にヘパリンとMnCl₂を添加した。サンプルを90℃で3分変性し、17.5% ポリアクリルアミド/8M 尿素ゲルでの変性ゲル電気泳動にかけた。ゲルを正に荷電したナイロン膜(Roche Molecular Biochemicals)にブロッティングし、プロットを製造業者の説明書に従ってCPD-Star (Roche Molecular Biochemicals)により発色させた。

【0051】実施例4

lacIをベースとしたPCR忠実度アッセイ

本発明者らは、FreyとSuppmannにより報告された(Frey, M. and Suppmann, B. (1995) Biochemica, 2, 34-35)、lacIをベースとしたPCR忠実度アッセイを用いた。この方法は、pUC19誘導体であるpUCQ17(機能性lacI^q対立遺伝子を含む)の増幅、環化および形質転換に基づくものである(Barnes, W.M. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 91, 2216-2220)。PCRにより誘導されるlacIの突然変異は、lacZ α の発現の抑制解除とその後の機能性 β -ガラクトシダーゼ酵素の形成をもたらし、この酵素はX-Gal指示プレート上で簡単に検出することができる。

【0052】pUC19の末端切断lacI遺伝子をlacI^qの機能性コピーで置換するために、178bpのPvuII-AflIIIフラグメントを、lacI^qをコードする1121bpのDNAフラグメントで置き換えた。 α -相補性大腸菌DH5 α 株は、得られたプラスミドpUCIQ17(3632bp)で形質転換すると、アンピシリン(100 μg/ml)とX-Gal(0.004% w/v)を含むLBプレート上に白色(LACI⁺)コロニーを生ずる。PCRのために、pUCIQ17をDraIIで消化して線状となし、1または10ngの量で鋳型として用いた。両プライマーはその5'末端にClaI切断部位を有する。オリゴヌクレオチドCla33 (34mer、24個が一致：配列番号8：5'-AGC TTA TCG ATG GCA CTT TTC GGG GAA ATG TGC G-3')およびオリゴヌクレオチドCla55 (36mer、26個が一致：配列番号9：5'-AGC TTA TCG ATA AGC GGA TGC CGG GAG CAG ACA AGC-3')は3493bpのPCR産物をもたらした。反応は以下に記載するTagポリメラーゼPCRバッファー中で1または5 pmolのタンパク質を用いて、また、対照反応として2.5Uの酵素を含む製造業者のPCRバッファー中で行なった。サイクル条件は94℃で10秒の変性、57℃で30秒のアニーリング、72℃で4分の伸長とし、酵素に応じて18、24または30サイクル行なった。

【0053】PCR後、増幅産物の収量をOD_{260nm}でまたはアガロースゲルにて調べ、その後あらゆるタンパク質を排除するためにDNAフラグメントをフェノール/クロロホルム抽出にかけた。ClaIで消化した後、DNAフラグメントを分離用アガロースゲルで精製した。Rapid Ligation Kit (Roche Molecular Biochemicals)を使って連結反応を実施し、この反応は30ngのDNAを含んでいた。得られた環状プラスミドを用いて、Hanahanが報じたと通りに(Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, 557-580)、大腸菌DH5 α を形質転換し、上記のLB Amp/X-Galプレート上にまいた。37℃で一夜インキュベートした後、青色と白色のコロニーを数えた。KeohavongとThilly (Keohavong, P. and Thilly, W.G. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 9253-9257)により発表された再配列方程式： $f = -\ln F / d \times b$ bpを使って、bpあたりのエラー率(f)を求めた。ここで、Fは白色コロニーの比率(白色コロニー/全コロニー)であり、dはDNA重複の数、すなわち、2^d = アウトプットDNA/インプットDNAであり、bはlacI遺伝子の有効標的サイズ(1080bp)である。lacI遺伝子内には、179個のコドン(コード領域の約50%)で349の単一塩基置換(ナンセンスおよびミスセンス)が表現型的に(発色スクリーニングにより)確認された(Provost, G.S., Kretz, P.L., Harnner, R. T., Matthews, C.D., Rogers, B.J., Lundberg, K.S., Dyaico, M.J. and Short, J.M. (1993) Mut. Research

h, 288, 133-149)。lacIの1080bpオープンリーディングフレーム内のあらゆる位置で起こりうるフレームシフトエラーについては考慮に入れなかった。なぜなら、Taq DNAポリメラーゼを除いて、PCR系で用いる特定のポリメラーゼに関する情報はほとんど入手できないからである。

【0054】実施例5

ポリメラーゼ連鎖反応

PCRは、Tag DNAポリメラーゼおよびその変異体のために最適化したバッファー、すなわち、10mM Tris-HCl/pH8.9、75mM KCl、1.5mM MgCl₂、10mM CHAPS、200μM dNTP 中で行なった。10ngのλDNAを鋳型として使用し、30pmol 1ずつのプライマー（20bp、所望の長さの産物を生成するように設計したもの）：

λ1（普遍的フォワードプライマー）：5'-GAT GAG TTC GTG TCC GTA CAA CA-3'（配列番号10）、

λ3.3：5'-CTC ATC AGC AGA TCA TCT TCA GG-3'（配列番号11）、

λ8：5'-ACT CCA GCG TCT CAT CTT TAT GC-3'（配列番号12）、

λ9：5'-GAT GGT GAT CCT CTC TCG TTT GC-3'（配列番号13）、

を用いた。λ3.3、8および9は、それぞれ3.3kb、5kb および7.5kbのフラグメントを増幅するためのリバースプライマーである。

【0055】鋳型、プライマーおよびヌクレオチドを25 μl容量の混合物1として調製した。次に、バッファー

と酵素（1 pmolの野生型および変異型Tag酵素、または2.5Uの対照酵素）を含む25 μlの混合物2を加えた。すべての反応を2回反復して行なった。増幅は2400 GeneAmpサーモサイクラー(Perkin Elmer)で実施した。サイクル条件は、94℃で2分後、94℃で10秒の変性、58℃で30秒のアニーリング、72℃での伸長を10サイクルとした。伸長時間は産物の長さにより変えた（3.3kbの場合が3分、5kbの場合が4.3分、7.5kbの場合が7分）。伸長時間を20秒/サイクルだけ延ばして、別の20サイクルを実施した。最後に72℃で7分反応させた。1%アガロースゲル電気泳動で分離するまでチューブを4℃で保存した。

【0056】さらに、Tagポリメラーゼ変異体のPCR性能の向上については、「時間依存的PCR」でも調べた。上記のようにλDNAから2kbフラグメントを増幅させた。これらの実験では、PCRの伸長時間を段階的に（90秒、40秒、30秒）短縮し、各酵素について2kbフラグメントを増幅するのに十分な最小伸長時間を決定した。下記のプライマーを用いた：

λ1（普遍的フォワードプライマー）：5'-GAT GAG TTC GTG TCC GTA CAA CA-3'（配列番号14）、

λ6（リバースプライマー）：5'-CTT CAT CAT CGA GAT AGC TGT CG-3'（配列番号15）、

温度プロフィールは上記のとおりとした。伸長時間は30サイクルにわたって一定に保った。

【0057】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Roche Diagnostics GmbH
<120> Mutant B-type DNA polymerase exhibiting improved performance in PC
R
<130> PA01-077
<140>
<141>
<150> 00105155.6
<151> 2000 - 3 - 11
<160> 34
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificial
<400> 1
gcaaccttgt agagtagagt ggtacctgtt aaggg
<210> 2
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 2
 gcctctttcc ggctctttta cgtatcctcc caggaaagta gtcc 44
 <210> 3
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 3
 gcctctttcc ggctctttta cgtatcctcc caggtgagta gtcc 44
 <210> 4
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 4
 gcctctttcc ggctctttta cgtatcctcc caggttagta gtcc 44
 <210> 5
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 5
 gcctctttcc ggctctttta cgtatcctcc cagggaagta gtcc 44
 <210> 6
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 6
 gcctctttcc ggctctttta cgtatcctcc cagccaagta gtcc 44
 <210> 7
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 7
 gcctctttcc ggctctttta cgtatccagc caggttagta gtcc 44
 <210> 8
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 8
 agcttatcga tggcactttt cggggaatg tgcg 34
 <210> 9
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 9
 agcttatcga taagcggatg cgggagcag acaagc 36
 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 10
 gatgagttcg tgtccgtaca aca 23
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 11
 ctcatcagca gatcatcttc agg 23
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 12
 actccagcgt ctcatcttta tgc 23
 <210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Artificial
 <400> 13
 gatggtgatc ctctctcggt tgc 23
 <210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 14

gatgagttcg tgtccgtaca aca

23

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificial

<400> 15

cttcatcatc gagatagctg tcg

23

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> T. aggregans

<400> 16

Glu Tyr Arg Arg Arg Leu Arg Thr Thr Tyr Leu Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> T. litoralis

<400> 17

Glu Tyr Lys Arg Arg Leu Arg Thr Thr Tyr Leu Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> T. fumicolans

<400> 18

Glu Leu Glu Arg Arg Xaa Arg Gly Gly Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> T. spec. 9N7

<400> 19

Glu Leu Ala Arg Arg Xaa Arg Gly Gly Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Arg Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> T. gorgonarius

<400> 20

Glu Leu Ala Arg Arg Xaa Arg Glu Ser Tyr Ala Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> P. spec. KOD

<400> 21

Glu Leu Ala Arg Arg Xaa Arg Gln Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> P. abyssii

<400> 22

Glu Tyr Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> P. furiosus

<400> 23

Glu Tyr Gln Arg Arg Leu Arg Glu Ser Tyr Thr Gly Gly Phe Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 24

<211> 25

<212> PRT

<213> P. horikoshii

<400> 24

Glu Tyr Glu Arg Arg Leu Arg Glu Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Lys Gly Leu Trp Glu Asn

20 25

<210> 25

<211> 25

<212> PRT

<213> M. jannaschii

<400> 25

Glu Tyr Arg Arg Arg Val Leu Thr Thr Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys

1 5 10 15

Glu Pro Glu Lys Gly Met Phe Glu Asp
 20 25
 <210> 26
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *M. voltae*
 <400> 26
 Ser Tyr Arg Glu Arg Ala Lys Phe Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Arg
 1 5 10 15
 Glu Pro Leu Lys Gly Ile Gln Glu Asn
 20 25
 <210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *S. solfataricus*
 <400> 27
 Thr Ser Ala Leu Ile Lys Gly Lys Gly Tyr Lys Gly Ala Val Val Ile
 1 5 10 15
 Asp Pro Pro Ala Gly Ile Phe Phe Asn
 20 25
 <210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *S. acidocaldarius*
 <400> 28
 Thr Ala Ala Val Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Lys Gly Ala Val Val Ile
 1 5 10 15
 Asp Pro Pro Ala Gly Val Tyr Phe Asn
 20 25
 <210> 29
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *P. islandicum*
 <400> 29
 Thr Lys Ala Ile Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Ala Gly Ala Val Val Leu
 1 5 10 15
 Asp Pro Pro Leu Gly Ile Phe Phe Asn
 20 25
 <210> 30
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *P. occultum*
 <400> 30
 Ser Glu Ala Leu Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Gln Gly Ala Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Asp Pro Pro Ser Gly Ile Tyr Phe Asn
 20 25
 <210> 31
 <211> 25

<212> PRT

<213> A. pernix

<400> 31

Val	Gly	Ala	Ile	Ile	Lys	Asp	Lys	Lys	Tyr	Arg	Gly	Ala	Ile	Val	Leu
1				5					10					15	
Asp	Pro	Pro	Val	Gly	Ile	Phe	Phe	Arg							
			20					25							

<210> 32

<211> 25

<212> PRT

<213> S. chwakuensis

<400> 32

Thr	Ala	Ala	Ile	Ser	Lys	Gly	Lys	Arg	Tyr	Lys	Gly	Ala	Val	Val	Ile
1				5					10					15	
Asp	Pro	Pro	Ala	Gly	Val	Phe	Phe	Asn							
			20					25							

<210> 33

<211> 2325

<212> DNA

<213> T. aggregans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2325)

<400> 33

atg	ata	ttt	gac	act	gac	tac	ata	aca	aag	gac	ggt	aaa	ccc	ata	att	48
Met	Ile	Phe	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ile	Thr	Lys	Asp	Gly	Lys	Pro	Ile	Ile	
1				5					10					15		
cga	att	ttc	aag	aaa	gag	aac	ggg	gaa	ttt	aaa	ata	gaa	ctt	gat	cca	96
Arg	Ile	Phe	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Glu	Phe	Lys	Ile	Glu	Leu	Asp	Pro	
			20					25					30			
cat	ttt	cag	ccc	tac	att	tac	gct	ctt	ctc	aaa	gat	gac	tcc	gct	att	144
His	Phe	Gln	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Ser	Ala	Ile	
		35					40					45				
gat	gaa	ata	aaa	gca	ata	aaa	ggc	gag	aga	cac	gga	aaa	att	gtg	aga	192
Asp	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Lys	Gly	Glu	Arg	His	Gly	Lys	Ile	Val	Arg	
		50				55				60						
gta	gtc	gat	gca	gtg	aaa	gtc	aag	aag	aaa	ttt	ttg	ggg	aga	gat	gtt	240
Val	Val	Asp	Ala	Val	Lys	Val	Lys	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly	Arg	Asp	Val	
	65			70					75				80			
gag	gtc	tgg	aag	ctt	ata	ttt	gag	cat	ccc	caa	gac	gtc	ccg	gcc	cta	288
Glu	Val	Trp	Lys	Leu	Ile	Phe	Glu	His	Pro	Gln	Asp	Val	Pro	Ala	Leu	
			85					90				95				
agg	ggc	aag	ata	agg	gaa	cat	cca	gct	gtg	att	gac	att	tat	gag	tac	336
Arg	Gly	Lys	Ile	Arg	Glu	His	Pro	Ala	Val	Ile	Asp	Ile	Tyr	Glu	Tyr	
		100						105				110				
gac	ata	ccc	ttt	gcc	aag	cgc	tac	ctc	ata	gac	aag	ggc	ttg	atc	cct	384
Asp	Ile	Pro	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asp	Lys	Gly	Leu	Ile	Pro	
		115					120					125				
atg	gag	ggc	gac	gag	gag	ctt	aag	cta	atg	gcc	ttc	gac	att	gag	acg	432

Met	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	Leu	Lys	Leu	Met	Ala	Phe	Asp	Ile	Glu	Thr	
130						135				140						
ttt	tac	cac	gag	gga	gac	gag	ttt	ggg	aag	ggc	gag	ata	ata	atg	ata	480
Phe	Tyr	His	Glu	Gly	Asp	Glu	Phe	Gly	Lys	Gly	Glu	Ile	Ile	Met	Ile	
145				150				155						160		
agc	tac	gcc	gat	gag	gaa	gag	gca	agg	gta	att	aca	tgg	aag	aat	att	528
Ser	Tyr	Ala	Asp	Glu	Glu	Glu	Ala	Arg	Val	Ile	Thr	Trp	Lys	Asn	Ile	
			165					170						175		
gat	ctg	ccc	tac	gtt	gat	gtt	gta	tcc	aac	gaa	agg	gag	atg	ata	aag	576
Asp	Leu	Pro	Tyr	Val	Asp	Val	Val	Ser	Asn	Glu	Arg	Glu	Met	Ile	Lys	
			180					185						190		
cgg	ttt	gtg	caa	att	gtc	agg	gaa	aaa	gac	ccg	gat	gtc	ctg	ata	act	624
Arg	Phe	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Glu	Lys	Asp	Pro	Asp	Val	Leu	Ile	Thr	
	195					200				205						
tac	aat	gga	gac	aac	ttt	gat	ttg	ccg	tac	ctt	ata	aaa	agg	gca	gag	672
Tyr	Asn	Gly	Asp	Asn	Phe	Asp	Leu	Pro	Tyr	Leu	Ile	Lys	Arg	Ala	Glu	
	210				215					220						
aag	tta	gga	gtt	act	ctt	ctc	ttg	ggg	agg	gac	aaa	gaa	cac	ccc	gag	720
Lys	Leu	Gly	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Gly	Arg	Asp	Lys	Glu	His	Pro	Glu	
225			230					235						240		
ccc	aag	att	cac	aga	atg	ggc	gat	agc	ttt	gcc	gtg	gaa	att	aaa	ggc	768
Pro	Lys	Ile	His	Arg	Met	Gly	Asp	Ser	Phe	Ala	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
			245					250						255		
aga	att	cac	ttt	gat	ctc	ttc	ccg	gtt	gtg	cgg	aga	acc	ata	aac	ctc	816
Arg	Ile	His	Phe	Asp	Leu	Phe	Pro	Val	Val	Arg	Arg	Thr	Ile	Asn	Leu	
			260					265						270		
cca	aca	tac	acg	ctt	gag	gca	gtt	tat	gaa	gcc	gtc	ttg	gga	aaa	acc	864
Pro	Thr	Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Val	Tyr	Glu	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Thr	
			275					280						285		
aaa	agc	aag	ctg	ggc	gag	gaa	atc	gcc	gcc	atc	tgg	gaa	aca	gag		912
Lys	Ser	Lys	Leu	Gly	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala	Ala	Ile	Trp	Glu	Thr	Glu	
	290					295								300		
gag	agc	atg	aag	aag	ctg	gcc	cag	tac	tcg	atg	gaa	gat	gct	agg	gca	960
Glu	Ser	Met	Lys	Lys	Leu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Arg	Ala	
305				310				315						320		
act	tat	gaa	ctc	gga	aaa	gag	ttt	ttc	ccc	atg	gag	gca	gag	cta	gca	1008
Thr	Tyr	Glu	Leu	Gly	Lys	Glu	Phe	Phe	Pro	Met	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	
			325					330						335		
aag	cta	ata	ggc	caa	agc	gta	tgg	gac	gtc	tca	aga	tca	agc	act	ggc	1056
Lys	Leu	Ile	Gly	Gln	Ser	Val	Trp	Asp	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	
			340					345						350		
aac	ctt	gta	gag	tgg	tac	ctg	tta	agg	gtg	gca	tat	gag	agg	aat	gag	1104
Asn	Leu	Val	Glu	Trp	Tyr	Leu	Leu	Arg	Val	Ala	Tyr	Glu	Arg	Asn	Glu	
			355					360						365		
ctc	gct	ccg	aac	aag	ccg	gat	gaa	gaa	gag	tac	aga	agg	cgt	tta	agg	1152
Leu	Ala	Pro	Asn	Lys	Pro	Asp	Glu	Glu	Glu	Tyr	Arg	Arg	Arg	Leu	Arg	
			370					375						380		
act	act	tac	ctg	gga	gga	tac	gta	aaa	gag	ccg	gaa	aga	ggc	tta	tgg	1200
Thr	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Val	Lys	Glu	Pro	Glu	Arg	Gly	Leu	Trp	

385	390	395	400	
gag aac atc acc tat tta gac ttt agg tgc cta tac ccc tca att ata				1248
Glu Asn Ile Thr Tyr Leu Asp Phe Arg Cys Leu Tyr Pro Ser Ile Ile				
	405	410	415	
gtt acc cac aac gtc tcc cct gac act tta gaa aga gaa ggc tgc aag				1296
Val Thr His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Glu Arg Glu Gly Cys Lys				
	420	425	430	
aat tac gat gtt gcc ccg ata gta ggt tat aag ttc tgc aag gat ttt				1344
Asn Tyr Asp Val Ala Pro Ile Val Gly Tyr Lys Phe Cys Lys Asp Phe				
	435	440	445	
ccc ggt ttc att cca tct ata ctc ggg gaa tta atc aca atg agg caa				1392
Pro Gly Phe Ile Pro Ser Ile Leu Gly Glu Leu Ile Thr Met Arg Gln				
	450	455	460	
gaa ata aag aag aag atg aaa gct aca att gac cca ata gaa aag aaa				1440
Glu Ile Lys Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Lys Lys				
	465	470	475	
atg ctt gat tat agg caa aga gct gtt aaa ttg cac gca aac agc tat				1488
Met Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Val Lys Leu His Ala Asn Ser Tyr				
	485	490	495	
tac ggt tat atg ggc tat ccc aag gcg agg tgg tac tcg aag gaa tgt				1536
Tyr Gly Tyr Met Gly Tyr Pro Lys Ala Arg Trp Tyr Ser Lys Glu Cys				
	500	505	510	
gcc gaa agc gtt acc gcg tgg gga agg cac tac ata gaa atg acc ata				1584
Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg His Tyr Ile Glu Met Thr Ile				
	515	520	525	
aaa gag ata gag gag aaa ttt gga ttt aag gtg cta tat gcc gac act				1632
Lys Glu Ile Glu Glu Lys Phe Gly Phe Lys Val Leu Tyr Ala Asp Thr				
	530	535	540	
gat ggt ttt tac gcc aca ata ccg gga gaa aaa cct gaa aca atc aaa				1680
Asp Gly Phe Tyr Ala Thr Ile Pro Gly Glu Lys Pro Glu Thr Ile Lys				
	545	550	555	
aag aaa gct aag gaa ttc tta aaa tac ata aac tcc aaa ctt ccc ggt				1728
Lys Lys Ala Lys Glu Phe Leu Lys Tyr Ile Asn Ser Lys Leu Pro Gly				
	565	570	575	
ctg ctc gag ctt gag tat gag ggc ttt tac ttg aga gga ttt ttc gtc				1776
Leu Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Leu Arg Gly Phe Phe Val				
	580	585	590	
gca aag aag cgc tat gcg gtt ata gac gaa gaa ggt agg ata acg aca				1824
Ala Lys Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Arg Ile Thr Thr				
	595	600	605	
agg ggt ctg gaa gtt gta agg agg gac tgg agc gaa ata gcc aaa gag				1872
Arg Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu				
	610	615	620	
acc cag gct aaa gtc ttg gag gca ata ctt aaa gaa gat agt gtc gaa				1920
Thr Gln Ala Lys Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys Glu Asp Ser Val Glu				
	625	630	635	
aaa gct gtg gaa atc gtt aag gac gtt gtt gag gag ata gca aaa tac				1968
Lys Ala Val Glu Ile Val Lys Asp Val Val Glu Glu Ile Ala Lys Tyr				
	645	650	655	

```

caa gtc ccg ctt gaa aag ctt gtt atc cac gag cag att acc aag gat   2016
Gln Val Pro Leu Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Lys Asp
      660              665              670
cta agt gaa tac aaa gcc att ggg cct cat gta gca ata gca aag agg   2064
Leu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Ile Ala Lys Arg
      675              680              685
ctt gct gca aag gga ata aaa gtg aga ccc ggc acg ata ata agc tat   2112
Leu Ala Ala Lys Gly Ile Lys Val Arg Pro Gly Thr Ile Ile Ser Tyr
      690              695              700
atc gtc ctc agg gga agc gga aag ata agt gac agg gta att ttg ctt   2160
Ile Val Leu Arg Gly Ser Gly Lys Ile Ser Asp Arg Val Ile Leu Leu
      705              710              715              720
tca gag tat gat ccg aaa aaa cac aag tac gac ccc gac tac tac ata   2208
Ser Glu Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Pro Asp Tyr Tyr Ile
      725              730              735
gaa aac caa gtt ctg ccg gcg gtg ctt agg atc ctt gaa gcc ttc ggc   2256
Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Ala Phe Gly
      740              745              750
tac aga aaa gag gac tta aaa tac caa agc tca aaa cag gtt gga ctg   2304
Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Lys Tyr Gln Ser Ser Lys Gln Val Gly Leu
      755              760              765
gac gcg tgg ctt aag aag tag   2325
Asp Ala Trp Leu Lys Lys
      770              775
<210> 34
<211> 775
<212> PRT
<213> T. aggregans
<400> 34
Met Ile Phe Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Lys Asp Gly Lys Pro Ile Ile
  1              5              10              15
Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Leu Asp Pro
      20              25              30
His Phe Gln Pro Tyr Ile Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
      35              40              45
Asp Glu Ile Lys Ala Ile Lys Gly Glu Arg His Gly Lys Ile Val Arg
      50              55              60
Val Val Asp Ala Val Lys Val Lys Lys Lys Phe Leu Gly Arg Asp Val
      65              70              75              80
Glu Val Trp Lys Leu Ile Phe Glu His Pro Gln Asp Val Pro Ala Leu
      85              90              95
Arg Gly Lys Ile Arg Glu His Pro Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
      100              105              110
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Ile Pro
      115              120              125
Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Leu Met Ala Phe Asp Ile Glu Thr
      130              135              140
Phe Tyr His Glu Gly Asp Glu Phe Gly Lys Gly Glu Ile Ile Met Ile
      145              150              155              160
Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Glu Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Ile

```

165					170					175						
Asp	Leu	Pro	Tyr	Val	Asp	Val	Val	Ser	Asn	Glu	Arg	Glu	Met	Ile	Lys	
180					185					190						
Arg	Phe	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Glu	Lys	Asp	Pro	Asp	Val	Leu	Ile	Thr	
195					200					205						
Tyr	Asn	Gly	Asp	Asn	Phe	Asp	Leu	Pro	Tyr	Leu	Ile	Lys	Arg	Ala	Glu	
210					215					220						
Lys	Leu	Gly	Val	Thr	Leu	Leu	Leu	Gly	Arg	Asp	Lys	Glu	His	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Pro	Lys	Ile	His	Arg	Met	Gly	Asp	Ser	Phe	Ala	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
245					250					255						
Arg	Ile	His	Phe	Asp	Leu	Phe	Pro	Val	Val	Arg	Arg	Thr	Ile	Asn	Leu	
260					265					270						
Pro	Thr	Tyr	Thr	Leu	Glu	Ala	Val	Tyr	Glu	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Thr	
275					280					285						
Lys	Ser	Lys	Leu	Gly	Ala	Glu	Glu	Ile	Ala	Ala	Ile	Trp	Glu	Thr	Glu	
290					295					300						
Glu	Ser	Met	Lys	Lys	Leu	Ala	Gln	Tyr	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Arg	Ala	
305					310					315					320	
Thr	Tyr	Glu	Leu	Gly	Lys	Glu	Phe	Phe	Pro	Met	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	
325					330					335						
Lys	Leu	Ile	Gly	Gln	Ser	Val	Trp	Asp	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	
340					345					350						
Asn	Leu	Val	Glu	Trp	Tyr	Leu	Leu	Arg	Val	Ala	Tyr	Glu	Arg	Asn	Glu	
355					360					365						
Leu	Ala	Pro	Asn	Lys	Pro	Asp	Glu	Glu	Glu	Tyr	Arg	Arg	Arg	Leu	Arg	
370					375					380						
Thr	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Val	Lys	Glu	Pro	Glu	Arg	Gly	Leu	Trp	
385					390					395					400	
Glu	Asn	Ile	Thr	Tyr	Leu	Asp	Phe	Arg	Cys	Leu	Tyr	Pro	Ser	Ile	Ile	
405					410					415						
Val	Thr	His	Asn	Val	Ser	Pro	Asp	Thr	Leu	Glu	Arg	Glu	Gly	Cys	Lys	
420					425					430						
Asn	Tyr	Asp	Val	Ala	Pro	Ile	Val	Gly	Tyr	Lys	Phe	Cys	Lys	Asp	Phe	
435					440					445						
Pro	Gly	Phe	Ile	Pro	Ser	Ile	Leu	Gly	Glu	Leu	Ile	Thr	Met	Arg	Gln	
450					455					460						
Glu	Ile	Lys	Lys	Lys	Met	Lys	Ala	Thr	Ile	Asp	Pro	Ile	Glu	Lys	Lys	
465					470					475					480	
Met	Leu	Asp	Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Val	Lys	Leu	His	Ala	Asn	Ser	Tyr	
485					490					495						
Tyr	Gly	Tyr	Met	Gly	Tyr	Pro	Lys	Ala	Arg	Trp	Tyr	Ser	Lys	Glu	Cys	
500					505					510						
Ala	Glu	Ser	Val	Thr	Ala	Trp	Gly	Arg	His	Tyr	Ile	Glu	Met	Thr	Ile	
515					520					525						
Lys	Glu	Ile	Glu	Glu	Lys	Phe	Gly	Phe	Lys	Val	Leu	Tyr	Ala	Asp	Thr	
530					535					540						
Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Thr	Ile	Pro	Gly	Glu	Lys	Pro	Glu	Thr	Ile	Lys	
545					550					555					560	
Lys	Lys	Ala	Lys	Glu	Phe	Leu	Lys	Tyr	Ile	Asn	Ser	Lys	Leu	Pro	Gln	

565 570 575
 Leu Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Leu Arg Gly Phe Phe Val
 580 585 590
 Ala Lys Lys Arg Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Arg Ile Thr Thr
 595 600 605
 Arg Gly Leu Glu Val Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu
 610 615 620
 Thr Gln Ala Lys Val Leu Glu Ala Ile Leu Lys Glu Asp Ser Val Glu
 625 630 635 640
 Lys Ala Val Glu Ile Val Lys Asp Val Val Glu Glu Ile Ala Lys Tyr
 645 650 655
 Gln Val Pro Leu Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Lys Asp
 660 665 670
 Leu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gly Pro His Val Ala Ile Ala Lys Arg
 675 680 685
 Leu Ala Ala Lys Gly Ile Lys Val Arg Pro Gly Thr Ile Ile Ser Tyr
 690 695 700
 Ile Val Leu Arg Gly Ser Gly Lys Ile Ser Asp Arg Val Ile Leu Leu
 705 710 715 720
 Ser Glu Tyr Asp Pro Lys Lys His Lys Tyr Asp Pro Asp Tyr Tyr Ile
 725 730 735
 Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Leu Arg Ile Leu Glu Ala Phe Gly
 740 745 750
 Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Lys Tyr Gln Ser Ser Lys Gln Val Gly Leu
 755 760 765
 Asp Ala Trp Leu Lys Lys
 770 775

【図面の簡単な説明】

【図1】二本鎖DNAに対する、Tag DNAポリメラーゼおよびその変異体の相対的ポリメラーゼ活性(Pol)および3'-5'-エキソヌクレアーゼ活性(Exo)を示した図である。

【図2】Tag DNAポリメラーゼ変異体を用いて行なったPCRを示した図である。

【図3】最小伸長時間を決定するために、異なる伸長時間(表示したように90秒、40秒、30秒)を用いて行なった反応からの2kb PCR産物を示す1%アガロースゲル電気泳動の図である。

【図4】野生型および変異型Tag DNAポリメラーゼの3'-5'-エキソヌクレアーゼプロセシビティーを示した図である。

【図5】Tag DNAポリメラーゼ変異体の忠実度を示した図である。

【図6】精製した変異型タンパク質のSDS-PAGEゲル電気泳動分析を示した図である。

【図7】Tag DNAポリメラーゼ変異体の定性的エキソヌクレアーゼアッセイを示した図である。

【図8】euryarchaeaおよびcrenarchaeaのB型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列の多重アライメントから誘導された、Thermococcales目に由来するB型DNAポリメラーゼのコンセンサス配列モチーフを示した図である。

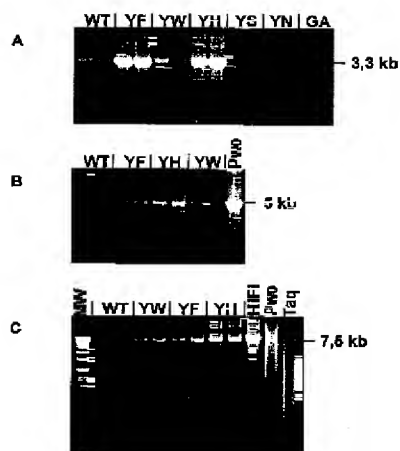
【図9】組換え野生型Tag DNAポリメラーゼのDNA配列および推定アミノ酸配列を示した図である。

【図1】

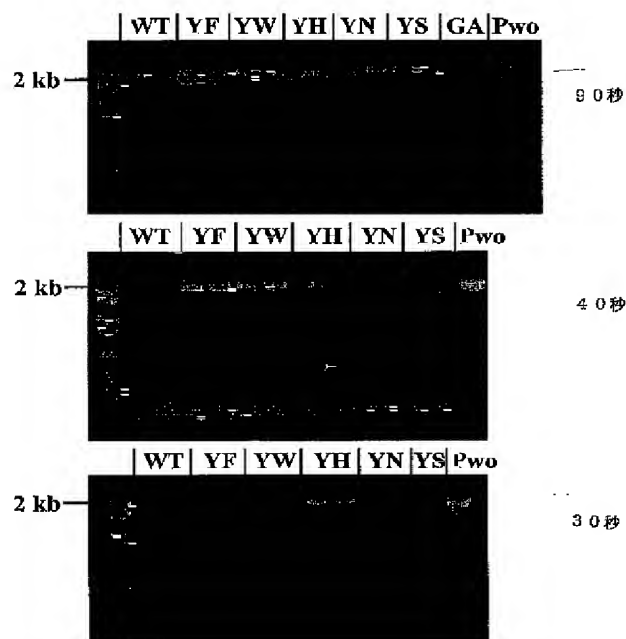
Pol活性およびExo活性(%)

	WT	Y387F	Y387W	Y387H	Y387N	Y387S	G989A
Pol	100	160	92	93.6	6.4	17.8	10.7
Exo	100	90	71	98	205	187	236
Pol/Exo	1	1.77	1.29	0.96	0.03	0.09	0.04

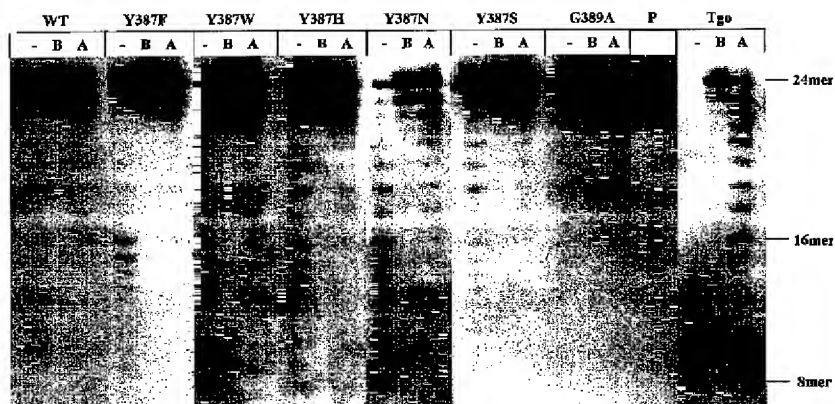
【図2】



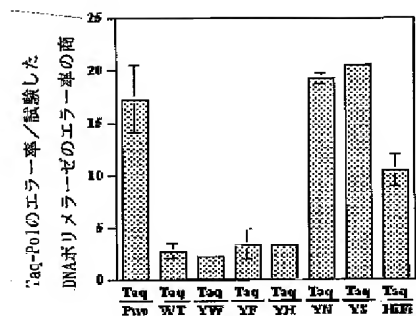
【図3】



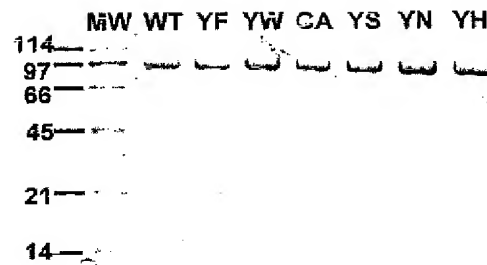
【図4】



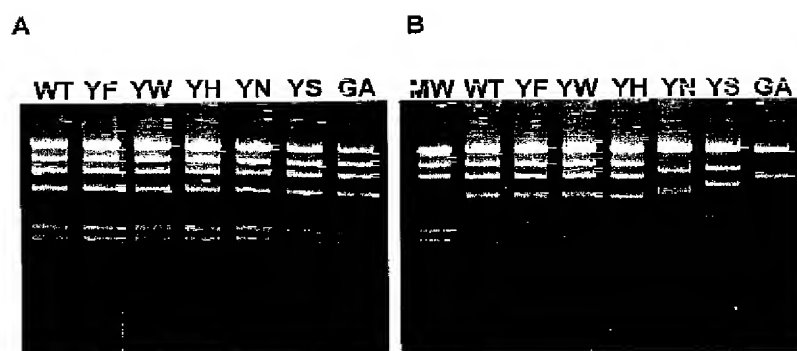
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

	E	R	R	R		G(Y)	K	E	E	L	W	E	コンセンサス														
<i>T. aggregans</i>	E	Y	R	R	R	L	R	T	T	Y	L	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N	
<i>T. litoralis</i>	E	Y	K	R	R	R	L	R	T	T	Y	L	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>T. tumicola</i>	E	L	E	R	R	-	R	G	G	Y	Y	A	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>T. spec. 9N7</i>	E	L	A	R	R	-	R	G	G	Y	Y	A	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>T. gorgonarius</i>	E	L	A	R	R	-	R	E	S	S	Y	E	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>P. spec. KOD</i>	E	L	A	R	R	-	R	Q	S	S	Y	E	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>P. abyssii</i>	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	S	Y	E	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>P. furiosus</i>	E	Y	Q	R	R	L	R	E	S	S	Y	T	G	G	F	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>P. horikoshii</i>	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	S	Y	E	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N
<i>M. jannaschii</i>	E	Y	R	E	R	V	T	T	T	Y	E	G	G	Y	V	K	E	P	E	R	G	L	W	E	N	N	D
<i>M. voltae</i>	S	Y	R	E	R	A	K	E	S	Y	E	G	G	Y	V	R	E	P	L	K	G	L	W	E	N	N	D
<i>S. solfataricus</i>	S	A	L	I	K	G	K	G	Y	K	G	A	V	V	I	D	P	P	A	G	I	F	F	N	N	N	N
<i>S. acidocaldarius</i>	T	A	A	V	I	K	G	K	K	Y	K	G	A	V	V	I	D	P	P	A	G	I	F	F	N	N	N
<i>P. islandicum</i>	T	K	A	I	I	K	G	K	K	Y	A	G	A	V	V	L	D	P	P	L	G	I	F	F	N	N	N
<i>P. occultum</i>	S	E	A	L	I	K	G	K	K	Y	O	G	A	L	V	L	D	P	P	S	G	I	F	F	N	N	N
<i>A. pernix</i>	V	G	A	I	I	K	D	K	K	Y	R	G	A	I	V	L	D	P	P	V	G	I	F	F	F	F	F
<i>S. chwaikuensis</i>	T	A	A	I	S	K	G	K	R	Y	K	G	A	V	V	I	D	P	P	A	G	I	F	F	N	N	N

配列番号16

配列番号17

配列番号18

配列番号19

配列番号20

配列番号21

配列番号22

配列番号23

配列番号24

配列番号25

配列番号26

配列番号27

配列番号28

配列番号29

配列番号30

配列番号31

配列番号32

【図9】

配列番号33

配列番号34

1/1

ATG ATA TTT GAC ACT GAC TAC ATA ACA AAG GAC GGT AAA CCC ATA ATT CGA ATT TTC AAG
 Met ile phe asp thr asp tyr ile thr lys asp gly lys pro ile ile arg ile phe lys
 61/21
 AAA GAG AAC GGG GAA TTT AAA ATA GAA CTT GAT CCA CAT TTT CAG CCC TAC ATT TAC GCT
 lys glu asn gly glu phe lys ile glu leu asp pro his phe gln pro tyr ile tyr ala
 121/41
 CTT CTC AAA GAT GAC TCC GCT ATT GAT GAA ATA AAA GCA ATA AAA GGC GAG AGA CAC GGA
 leu leu lys asp asp ser ala ile asp glu ile lys ala ile lys gly glu arg his gly
 181/61
 AAA ATT GTG AGA GTA GTC GAT GCA GTG AAA GTC AAG AAG AAA TTT TTG GGG AGA GAT GTT
 lys ile val arg val val asp ala val lys val lys lys lys phe leu gly arg asp val
 241/81
 GAG GTC TGG AAG CTT ATA TTT GAG CAT CCC CAA GAC GTC CCG GCC CTA AGG GGC AAG ATA
 glu val trp lys leu ile phe glu his pro gln asp val pro ala leu arg gly lys ile
 301/101
 AGG GAA CAT CCA GCT GTG ATT GAC ATT TAT GAG TAC GAC ATA CCC TTT GCC AAG CGC TAC
 arg glu his pro ala val ile asp ile tyr glu tyr asp ile pro phe ala lys arg tyr
 361/121
 CTC ATA GAC AAG GGC TTG ATC CCT ATG GAG GGC GAC GAG GAG CTT AAG CTA ATG GCC TTC
 leu ile asp lys gly leu ile pro met glu gly asp glu glu leu lys leu met ala phe
 421/141
 GAC ATT GAG ACG TTT TAC CAC GAG GGA GAC GAG TTT GGG AAG GGC GAG ATA ATA ATG ATA
 asp ile glu thr phe tyr his glu gly asp glu phe gly lys gly glu ile ile met ile
 481/161
 AGC TAC GCC GAT GAG GAA GAG GCA AGG GTA ATT ACA TGG AAG AAT ATT GAT CTG CCC TAC
 ser tyr ala asp glu glu glu ala arg val ile thr trp lys asn ile asp leu pro tyr
 541/181
 GTT GAT GTT CTA TCC AAC GAA AGG GAG ATG ATA AAG CGG TTT GTG CAA ATT GTC AGG GAA
 val asp val val ser asn glu arg glu met ile lys arg phe val gln ile val arg glu
 601/201
 AAA GAC CCG GAT GTC CTG ATA ACT TAC AAT GGA GAC AAC TTT GAT TTG CCG TAC CTT ATA
 lys asp pro asp val leu ile thr tyr asn gly asp asn phe asp leu pro tyr leu ile
 661/221
 AAA AGG GCA GAG AAG TTA GGA GTT ACT CTT CTC TTC GGG AGG GAC AAA GAA CAC CCC GAG
 lys arg ala glu lys leu gly val thr leu leu leu gly arg asp lys glu his pro glu
 721/241
 CCC AAG ATT CAC AGA ATG GGC GAT AGC TTT GCC GTG GAA ATT AAA GGC AGA ATT CAC TTT
 pro lys ile his arg met gly asp ser phe ala val glu ile lys gly arg ile his phe
 781/261
 GAT CTC TTC CCG GTT GCG CGG AGA AUC ATA AAC CTC CCA ACA TAC ACG CTT GAG GCA GTT
 asp leu phe pro val val arg arg thr ile asn leu pro thr tyr thr leu glu ala val
 841/281
 TAT GAA GCC GTC TTG GGA AAA ACC AAT AGC AAG CTG GGT GCG GAG GAA ATC GCC GCC ATC
 tyr glu ala val leu gly lys thr lys ser lys leu gly ala glu glu ile ala ala ile
 901/301
 TGG GAA ACA GAG GAG AGC ATG AAG AAG CTG GCC CAG TAC TCG ATG GAA GAT GCT AGG GCA
 trp glu thr glu glu ser met lys lys leu ala glu tyr ser met glu asp ala arg ala
 961/321
 ACT TAT GAA CTC GGA AAA GAG TTT TTC CCC ATG GAG GCA GAG CTA GCA AAG CTA ATA GGC
 thr tyr glu leu gly lys glu phe phe pro met glu ala glu leu ala lys leu ile gly
 1021/341
 CAA AGC GTA TGG GAC GTC TCA AGA TCA AGC ACT GGC AAC CTT GTA GAG TGG TAC CTG TTA
 gln ser val trp asp val ser arg ser ser thr gly asn leu val glu trp tyr leu leu
 1081/361

配列番号33

配列番号34

AGG GTG GCA TAT GAC AGG AAT GAG CTC GCT CCG AAC AAG CCG GAT GAA GAA GAG TAC ACA
 arg val ala tyr glu arg asn glu leu ala pro asn lys pro asp glu glu glu tyr arg
 1141/381
 AGG CGT TTA AGG ACT ACT TAC CTG GGA GGA TAC GTA AAA GAG CCG GAA AGA GGC TTA TGG
 arg arg leu arg thr thr tyr leu gly gly tyr val lys glu pro glu arg gly leu trp
 1201/401
 GAG AAC ATC ACC TAT TTA GAC TTT ACG TGC CTA TAC CCC TCA ATT ATA GTT ACC CAC AAC
 glu asn ile thr tyr leu asp phe arg cys leu tyr pro ser ile ile val thr his asn
 1261/421
 GTC TCC CCT GAC ACT TTA GAA AGA GAA GGC TGC AAG AAT TAC GAT GGT GCC CCG ATA GTA
 val ser pro asp thr leu glu arg glu gly cys lys asn tyr asp val ala pro ile val
 1321/441
 GGT TAT AAG TTC TGC AAG CAT TTT CCC GGT TTC ATT CCA TCT ATA CTC GGG GAA TTA ATC
 gly tyr lys phe cys lys asp phe pro gly phe ile pro ser ile leu gly glu leu ile
 1381/461
 ACA ATG AGG CAA GAA ATA AAG AAG AAG ATG AAA GCT ACA ATT GAC CCA ATA GAA AAG AAA
 thr met arg gln glu ile lys lys lys met lys ala thr ile asp pro ile glu lys lys
 1441/481
 ATG CTT GAT TAT AGG CAA AGA GCT GTT AAA TTG CAC GCA AAC ACC TAT TAC GGT TAT ATG
 met leu asp tyr arg gln arg ala val lys leu his ala asn ser tyr tyr gly tyr met
 1501/501
 GGC TAT CCC AAG GCG AGG TGG TAC TCG AAG GAA TGT GCC GAA AGC GTT ACC GCG TGG GGA
 gly tyr pro lys ala arg trp tyr ser lys glu cys ala glu ser val thr ala trp gly
 1561/521
 AGG CAC TAC ATA GAA ATG ACC ATA AAA GAG ATA GAC GAG AAA TTT GGA TTT AAG GTG CTA
 arg his tyr ile glu met thr ile lys glu ile glu glu lys phe gly phe lys val leu
 1621/541
 TAT GCC GAC ACT GAT GGT TTT TAC CCC ACA ATA CCG GGA GAA AAA CCT GAA ACA ATC AAA
 tyr ala asp thr asp gly phe tyr ala thr ile pro gly glu lys pro glu thr ile lys
 1681/561
 AAG AAA GCT AAG GAA TTC TTA AAA TAC ATA AAC TCC AAA CTT CCC GGT CTG CTC GAG CTT
 lys lys ala lys glu phe leu lys tyr ile asn ser lys leu pro gly leu leu glu leu
 1741/581
 GAG TAT GAG GGC TTT TAC TTG AGA GGA TTT TTC GTC GCA AAG AAG CGC TAT GCG GTT ATA
 glu tyr glu gly phe tyr leu arg gly phe phe val ala lys lys arg tyr ala val ile
 1801/601
 GAC GAA GAA GGT AGG ATA ACG ACA AGG CCT CTG GAA GTT GTA AGG AGG GAC TCG AGC GAA
 asp glu glu gly arg ile thr thr arg gly leu glu val val arg arg asp trp ser glu
 1861/621
 ATA GCC AAA GAG ACC CAG GCT AAA GTC TTG GAG GCA ATA CTT AAA GAA GAT AGT GTC GAA
 ile ala lys glu thr gln ala lys val leu glu ala ile leu lys glu asp ser val glu
 1921/641
 AAA GCT GTG GAA ATC GTT AAG GAC GTT GTT GAG CAG ATA GCA AAA TAC CAA GTC CCG CTT
 lys ala val glu ile val lys asp val val glu glu ile ala lys tyr gln val pro leu
 1981/661
 GAA AAG CTT GTT ATC CAC GAG CAG ATT ACC AAG GAT CTA AGT GAA TAC AAA GCC ATT GGG
 glu lys leu val ile his glu gln ile thr lys asp leu ser glu tyr lys ala ile gly
 2041/681
 CCT CAT GTA GCA ATA GCA AAG AGG CTT GCT GCA AAG GGA ATA AAA GTG AGA CCC GGC ACG
 pro his val ala ile ala lys arg leu ala ala lys gly ile lys val arg pro gly thr
 2101/701
 ATA ATA AGC TAT ATC GTC CTC AGG GGA ACC GGA AAG ATA AGT GAC AGC CTA ATT TTG CTT
 ile ile ser tyr ile val leu arg gly ser gly lys ile ser asp arg val ile leu leu
 2161/721

配列番号33

配列番号34

TCA GAG TAT GAT CCG AAA AAA CAC AAG TAC GAC CCG GAC TAC TAC ATA GAA AAC CAA GTT
 ser glu tyr asp pro lys lys his lys tyr asp pro asp tyr tyr ile glu asn gln val
 2221/741
 CTG CCG GCG GTG CTT AGG ATC CTT GAA GCC TTC GGC TAC ACA AAA GAG GAC TTA AAA TAC
 leu pro ala val leu arg ile leu glu ala phe gly tyr arg lys glu asp leu lys tyr
 2281/761
 CAA AGC TCA AAA CAG GTT GGA CTG GAC GCG TGG CTT AAG AAG TAG
 gln ser ser lys gln val gly leu asp ala trp leu lys lys AMB

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
C 1 2 N 9/10		C 1 2 P 19/34	A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 1 2 P 19/34		5/00	A
(72)発明者 ガラベッド アントラニキアン		(72)発明者 フランセスカ マリア ピサーニ	
ドイツ連邦共和国 ディー-21218 シー		イタリア国 アイ-00140 ローマ ビア	
ベタルーヒットフェルド, スハフコーベン		ビー, クロース, 26	
グルンド 3		(72)発明者 モーゼ ロッシ	
(72)発明者 クリスティナ ボエールケ		イタリア国 アイ-80072 アーコフエリ	
ドイツ連邦共和国 ディー-22761 ハン		ス/ナポリ ビア ヒルスコラ 133	
ブルグ, ボックリスウェグ 5ビー			